第4卷第3期 动物学研究 Vol. 4, №3
1983年8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1983

尼罗罗非鱼 *Tilapia nilotica* 卵巢发育过程中液晶态类脂滴组织化学初步研究*

孙建民** 吴熙载
(武汉大学生物系)

我们研究了尼罗罗非鱼卵巢中的液晶态。用偏光显微镜观察到在第3和第4时相卵母细胞的胞质、滤泡细胞和部份间质区存在着双折射和多种形式的"马尔它十字"。电子显微镜观察到这些"马尔它十字"小滴是多层的膜结构。根据这些小滴的性质和结构，将其归属于溶致性液晶 (lyotropic liquid crystal) 的片层相 (lamellar phase)，即纯净相 (neat phase) (孙建民1981)。

了解这些液晶态类脂滴在卵子发生中的组织化学无疑有助于更深入了解生物发育过程中液晶态的生物学意义。为此，我们选用了脂类以及乳酸脱氢酶 (LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、6—磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (G-6-PDH)，β—羟基丁酸脱氢酶 (HBDH)，非特异性酯酶 (NLE)，脂肪酶，3β—羟—甾脱氢酶 (3β—HSD) 作为组织化学指标，比较了它们在不同发育时相卵母细胞及滤泡细胞中活性的差异。以期了解糖代谢、脂代谢和类固醇激素合成与液晶态类脂滴的关系。

糖分解代谢有三条途径，即无氧酵解、有氧氧化和磷酸戊糖支路。我们选取了各自的代表性酶：LDH (无氧酵解)；SDH, MDH (有氧氧化)；G—6—PDH (磷酸戊糖支路)。脂代谢途径也选取了相应的酶：HBDH (β—氧化)；NLE (水解短链脂肪酸的酯)，脂肪酶 (水解长链脂肪酸的酯)。类固醇激素合成选取了3β—HSD作为指标。

对鱼类卵母细胞的发育，人们早已从形态学、组织学、组织化学、超微结构诸方面作过详细的研究。Hoar(1957), Raven (1961), Balinsky(1957), Brachet(1981) 等人详细介绍了动物 (包括鱼类) 的卵子发生。Krishna(1950), Chopra (1958, 1961)，熊平英 (1962)，朱洪文 (1963)，余先觉 (1964)，施泉芳(1964)等人对一些鱼的性周期以及卵母细胞中某些成分的变化进行了研究。中国科学院动物所等结合外源激素作用的研究，也报导了一些酶在卵母细胞及滤泡细胞上的定位测定。

* 本文曾在中国鱼类学会1981年年会上宣读。

** 现在中国科学院水生生物研究所工作。

本文1982年1月23日收到，1983年1月19日收到修改稿。

本实验结合偏光显微镜的观察，以组织化学方法研究液晶态类脂滴与某些生理功能的关系。我们所采用的名词沿用本校原动物教研室对莫桑比克罗非鱼性周期研究中所用的液泡、卵黄球、脂肪滴。脂肪滴又可分为较小的脂滴（体积小，直径2～8μ，本文又称为类脂滴）和较大的脂肪球（体积较大，最大直径可达80—90μ左右）。

材 料 和 方 法

尼罗罗非鱼 *Tilapia nilotica* 取自长江水产研究所沙市分所、湖北省水产研究所、武汉市水产研究所、汉口养殖场。共实验19批，具体试验方法如下：

偏光显微镜观察 为了和组织化学切片相对应，取同一块冰冻组织块的切片，厚25—30μ。在切片上加一滴甘油封片，然后置于正交偏光显微镜下观察。

组织化学 雌鱼解剖后取其卵巢，立即置于冰冻切片机上切片或冰冻保存备用。显示酶活力的切片一般为10—15μ。切片在室温下(13—30°C)放置稍干，然后放入孵育液中孵育规定的时间，再洗涤、固定、封片。

PAS（高碘酸—Schiff法）：按McManus。

焦宁Y—甲基绿：按Kurnick。

苏丹黑B：按McManus。

乳酸脱氢酶（LDH），苹果酸脱氢酶（MDH），6—磷酸葡萄糖酸脱氢酶（G—6—PDH），β—羟基丁酸脱氢酶（HBDH）：按Hess，Scarpell Pearse（1958）。

琥珀酸脱氢酶（SDH）：按Nachlas（1957）。

非特异性酯酶（NLE）：按Pearse。

脂肪酶：按 Gomori。

3β—羟—甾脱氢酶（3β—HSD）：按Wattenberg（1958）。

实 验 结 果

（一）偏光显微镜观察：

第1和第2时相卵母细胞胞质内无双折射。第3时相卵母细胞胞质内出现一些小的双折射亮点，滤泡细胞有时只能见到极弱的双折射。第4时相卵母细胞胞质中脂肪和卵黄大量沉积。脂肪球出现，呈现为一个大的“马尔它十字”（直径大小约36—66μ，最大可达96μ）。胞质中也可见到小的“马尔它十字”（直径大小2—8μ），此即类脂滴。卵黄球内也可见到双折射亮点。滤泡上皮双折射强，高倍下可见到滤泡细胞靠近间质的边缘聚集有一些双折射亮点，有的可分清为“马尔它十字”。放射膜无双折射，但可见到有很小的双折射亮点分布〔图版Ⅰ—1、2〕。

第5时相卵子已经成熟，正处于排卵阶段。整个卵球较暗，可见卵黄粒为一个有双折射的多边形结晶，卵黄球由一些结晶状卵黄粒组成，整个卵球中几乎不见“马尔它十字”。

在较早期的第Ⅱ发育阶段卵巢中，卵子和滤泡上皮尚无双折射，部份间质区可见到

有一些杆状双折射物分布，杆长约5μ，它们是液晶态还是结晶态物质尚待研究。第Ⅳ阶段卵巢的间质中可见到一丛丛强双折射亮点区，高倍下可看出是一团“马尔它十字”（直径大小2—6μ）丛集，且与滤泡细胞边缘不能分辨〔图版Ⅰ—3〕。

（二）组织化学

本实验采用第Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ发育阶段的卵巢，即已包括大量的2、3、4、5时相卵母细胞，为便于叙述，只以卵母细胞时相为标准。

1．苏丹黑B：2时相卵子胞质阴性。3时相卵子胞质内分布着一些兰色颗粒，液泡周围成为深兰色的一圈，滤泡细胞中可以见到一些兰黑色小颗粒。4时相卵子被染成深兰色，放射膜和滤泡细胞中都可见到兰黑色小颗粒分布。5时相卵子中的卵黄粒被染成一个个深兰色的小球。可见，2时相卵子内无脂滴；3时相卵子内开始有较小的脂滴沉积；4时相卵子内充满脂肪球、卵黄球和类脂滴，对苏丹物质强着色，滤泡细胞与放射膜内也存在着类脂滴；5时相卵子内的卵黄球由卵黄粒组成，其卵黄粒含有类脂，被染成一个兰色的小球。这些脂类物质的分布与偏光显微镜所观察到的“马尔它十字”的分布是一致的。

2．PAS：2时相卵母细胞胞质阴性，卵膜阳性。3时相卵母细胞胞质内可见很多阳性反应的红色小颗粒，在液泡周围较为密集，泡内也可见红色颗粒；滤泡上皮阳性反应。4时相卵母细胞胞质显示强阳性，放射膜内可以清楚地看到一些红色小丝穿插其中，滤泡上皮阳性反应。5时相卵母细胞胞质阳性反应。由此可见，随着卵子的生长，糖类在卵子胞质内含量逐渐增加，滤泡细胞含有较多的糖类物质。

3．焦宁Y—甲基绿：2时相卵子胞质呈深红色。3时相卵子胞质为浅红色，液泡周围有深红色反应物。滤泡细胞核为绿色，胞质红色。4时相卵子胞质红色极浅，在较大的卵子内几无红色。滤泡细胞核呈绿色，胞质红色，成为一条紫红色的带。5时相卵子胞质几无红色。以上观察说明，卵母细胞愈小则胞质内所含RNA相对含量愈多。滤泡细胞胞质中含有较多的RNA。

以上这些脂类、糖类、核酸的组织化学检验与鲢鱼卵子等有关资料基本上是一致的。

4．LDH：乳酸脱氢酶在各发育阶段的卵巢中都表现出很强的活力。2时相卵子胞质强阳性反应。3时相卵子胞质中散布一些阳性反应的兰色颗粒。滤泡上皮强阳性，成为一个兰色园环。4时相卵子胞质阴性，仅中央核区阳性。滤泡上皮强阳性。5时相卵子胞质阴性。

乳酸脱氢酶是糖酵解的代表酶之一，它在鱼类卵巢中活力旺盛，说明卵巢中无氧酵解的活跃。可以看出，随着卵母细胞的生长，LDH在胞质内的活力渐弱，以至后来消失，但核区依然存在着活力。滤泡细胞在各阶段都存在较强的活力〔图版Ⅰ—4、5、6、7、8〕。

5．SDH：2时相卵子胞质强阳性反应，成为一个兰色小颗粒丛集的小球。3时相卵子胞质内分布有兰色颗粒，卵周边较为密集，向核渐少，有向卵周边聚集的趋势。4时相卵子胞质阴性。5时相卵子胞质也呈现阴性反应〔图版Ⅱ—1、2〕。琥珀酸脱氢

酶被认为是线粒体的指标，它在早期卵母细胞中活力旺盛，随着卵子发育渐向卵周边移动。在成熟的卵母细胞中已无活力。滤泡细胞中几乎不显示出活力。和LDH的切片比较，可以发现卵巢中LDH比SDH的活力明显要强。

6．MDH：2时相卵子胞质强阳性反应。3时相卵子胞质阳性，液泡周围更为密集，滤泡细胞阳性反应。4时相卵子胞质阴性，滤泡细胞阳性〔图版Ⅰ—9〕。苹果酸脱氢酶也是显示有氧氧化的标志酶之一。和SDH切片比较可以发现，随着卵母细胞的生长成熟，它们在胞质中的活性由强渐弱，以至后来消失。但它们在滤泡细胞中的活力强弱有所差异，这可能与糖元异生作用等有关，但还需要实验进一步研究说明。

7．G—6—PDH：各时相卵母细胞胞质都为阴性，但细胞核为阳性，滤泡细胞显示阳性。这说明反映磷酸戊糖支路的代表酶—6—磷酸葡萄糖酸脱氢酶在卵母细胞胞质中无活力，而在核内以及滤泡细胞内活力甚高〔图版Ⅰ—10〕。

8．HBDH：各时相卵母细胞胞质都为阴性，滤泡细胞显示阳性。β—羟基丁酸脱氢酶是脂肪酸分解的β—氧化途径中的一个重要酶。它的活性定位说明滤泡细胞能进行脂肪酸分解，以β—氧化作为一种供能途径，而卵母细胞胞质中则无此种能力。

9．NLE：各时相卵母细胞胞质都为阴性，滤泡细胞显示阳性，成为黑色片块沉淀。第Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ阶段卵巢的间质内都有强阳性反应的区域，成为一团团黑色沉淀〔图版Ⅰ—5、6、7、8〕。间质内NLE阳性反应区域与偏光十字丛集的双折射区的位置是一致的。

非特异性酯酶是一类水解单酯的酶。以醋酸α—萘酯为底物可以显示B型酯酶，水解胆固醇酯的胆固醇酯酶即属此类。王一飞等选用B型酯酶作为胆固醇酯酶的指标。因此，可以认为间质区及滤泡细胞内可以水解类脂滴上的胆固醇酯。

10．脂肪酶：2时相卵子胞质阴性。3时相卵子胞质内除液泡阴性以外都显示弱阳性，为浅黄色，滤泡细胞阴性。4时相卵子胞质显示棕黄色的阳性反应，滤泡细胞及间质区阴性。5时相卵子胞质阳性反应，可以看到卵黄粒成为一个个棕黑色小粒。滤泡细胞及间质区阴性〔图版Ⅰ—9〕。可以看出，卵母细胞体积愈大，则卵子胞质内脂肪酶活力愈大，脂肪酶活力主要分布于卵黄粒上。Pearse等人认为，脂肪酶是一类水解长链脂肪酸酯的酶。它在卵子中的活力存在的部位可能是甘油三酯代谢的区域，与非特异性酯酶活力的位置不同。

11．3β—HSD：各时相卵母细胞胞质阴性。第4和尚未排出体外的第5时相卵子的滤泡上皮成为一条不太强的兰色环带，显示不很强的活力，某些间质区也有阳性反应的兰色小块区〔图版Ⅰ—3、4〕。3β—羟—甾脱氢酶是类固醇激素合成中一个关键酶，它存在于滤泡细胞中，活力较弱，受营养条件影响极大。

从以上组织化学实验可以看出：随着卵母细胞逐渐生长，胞质中脂类和糖类含量逐渐增加。糖代谢中的LDH、SDH、MDH活力逐渐减弱，直至消失；而脂肪酶的活力增大。滤泡细胞积极参与了生理代谢，它的胞质内含有糖类、脂类、核酸和蛋白质。糖代谢和脂代谢的存在由LDH、MDH、G—6—PDH、HBDH、NLE的活力显示出来。而与类固醇激素合成有关的3β—HSD的存在则反映出滤泡细胞合成类固醇激素的能力。

讨　论

前已有文章报导了在鸡卵、鸡胚、鱼卵和鱼胚中出现的类脂滴在正交偏光显微镜下呈现为“马尔它十字”。薄层层析分析了这些类脂滴的组分，主要由磷脂、胆固醇酯、胆固醇和甘油三酯组成。这些类脂滴的力学性质像液体一具流动性，光学性质像固体一具双折射性。根据这些“马尔它十字”小滴的流动双折射性和水溶性等和电镜揭示的片层结构，认为它应属于溶致性液晶（何海平等，1978、1979；孙建民，1980、1981）。

这些液晶态类脂滴在鱼类卵子发生过程中的作用，我们也曾作过一些讨论。从本实验看来，卵子成熟过程中，胞质内沉积的脂肪球以后与蛋白质结合以脂蛋白结晶形式贮存。而间质区和滤泡细胞中的类脂滴有部分可能参与类固醇激素的合成。

鱼类卵巢合成类固醇激素的地区说法尚有差异。较早期的研究认为“排卵前黄体能形成硬骨鱼卵巢的主要内分泌组织，这在大部份硬骨鱼或所有硬骨鱼可能都如此。”Hoar总结了早期的工作后提出，鱼类的滤泡细胞有两种命运，一是排卵后迅速分解消失，另一种是特别发达而成为分泌激素的黄体细胞。还有的鱼部份滤泡从不产生成熟卵而成颗粒细胞或黄体细胞。近些年的工作指出，成熟过程中的滤泡细胞也存在着3β—羟—甾脱氢酶，也能分泌类固醇激素，且能促进卵子的成熟与生殖细胞的分化。根据组织化学检查，尼罗罗非鱼滤泡细胞能分泌类固醇激素。在部份间质区也观察有3β—羟—甾脱氢酶反应的兰色二甲腊沉淀。在间质的某些区域是否有颗粒细胞或黄体细胞存在，尚需进一步追踪其演变过程才能确定。类固醇激素的合成途径现在已基本上清楚。L·特雷格(1980) 已有详细的综述。王一飞等（1980）采用一套组织化学指标以指示类固醇激素合成的能力。我们采用一组相似的指标（脂类、NLE、LDH、G—6—PDH、3β—HSD）在滤泡细胞中得到阳性结果。

偏光显微镜检查发现滤泡细胞中存在的类脂滴呈现为“马尔它十字”的双折射现象，它以液晶态存在。因此我们认为，滤泡细胞中合成类固醇激素的前体物一胆固醇酯是贮存于液晶态的类脂滴上。换言之，卵巢滤泡细胞中合成类固醇激素的前体物是以液晶态形式存在。我们知道，液晶态是一种极敏感的物态，它对光、声、电、磁、机械力、温度、pH 值以及很多化学因子的微小变化产生反应。由此可以设想，如果用某种理化因子使其液晶态结构发生变化，使类固醇激素的合成得以受阻或促进，即可影响鱼体的生长或成熟，这将是令人感兴趣的课题。

脂肪酶的作用物为高级脂肪酸同甘油或其它醇构成的酯；非特异性酯酶的作用物为一单酯。这两种酶在罗非鱼卵巢中不同的定位看来也间接说明卵子内的脂肪球成分与卵外的类脂滴成分与功能的差异。间质和滤泡细胞中的类脂滴主要组分是磷脂、胆固醇酯以及少量胆固醇和甘油三酯。胆固醇能从磷脂膜层上被解离为胆固醇参加到类固醇激素合成。而成熟卵子内所含的脂肪球主要组分是甘油三酯，还有少量的磷脂、胆固醇。卵母细胞胞质内无β—羟基丁酸脱氢酶活力，即不进行脂肪酸分解的β—氧化。这里的脂肪酶可能是为以后的发育而用的。

结论

1.尼罗罗非鱼卵母细胞逐渐生长成熟，胞质内糖类、脂类含量逐渐增加；LDH、SDH、MDH活力渐弱，而脂肪酶活力渐强。

2.大生长期阶段的卵母细胞的滤泡细胞中，LDH保持较强的活力，MDH、G—6—PDH、NLE、3β—HSD的存在说明滤泡细胞具有合成类固醇激素的能力。

3.大生长期阶段的卵母细胞胞质中沉积的脂肪球和类脂滴，在正交偏光显微镜下呈现为"马尔它十字"，是一种液晶态物质。滤泡细胞中的液晶态类脂滴可能是类固醇激素合成的前体物。

参考文献

中国科学院动物研究所等 1977 中国科学 6，594.

王一飞等 1980 细胞生物学杂志 4，27.

朱洪文 1963 动物学报15（3），348.

孙建民 1980 武汉大学学报（自然科学版）4，101.

1981 武汉大学学报（自然科学版）3，119.

何海平等 1978 武汉大学学报（自然科学版）4，32.

1979 武汉大学学报（自然科学版）4，65.

余先觉 1964 武汉大学学报（自然科学版）2，81.

施瑔芳等 1964 水生生物学集刊 1（1）：77。

熊平英等 1962 武汉大学学报（自然科学版）2，91.

Pearse, A. G. E., 马仲魁等译 1965 组织化学，人民卫生出版社.

Brachet, J., 傅文庆译 1981 分子胚胎学引论，科学出版社.

L. 特雷格，邹继超译 1980 类固醇激素，科学出版社.

Balinsky, B. I., 1975 An introduction to embryology, 4th Ed., W. B. Saunders Company, philadelphia.

Chopra, H. C., 1958 *Quart. J. Microscop. Sci.*, 99, 149.

Hoar, W. S., 1957 in《The physiology of fishes》, Academic press, Inc. publishes, New York.

Raven, C. P., 1961 Oogenesis, pergamon press, New york.

Wattenberg, L. W., 1958 *J. Histochem. and Cytochem.* 6（4）：225.

A PRILIMINARY STUDY ON THE HISTOLOGICAL CHEMISTRY OF THE OVARY OF *TILAPIA NILOTICA* DURING ITS DEVELOPMENT

Sun jianmin and Wu xizai
(*Wuhan university*)

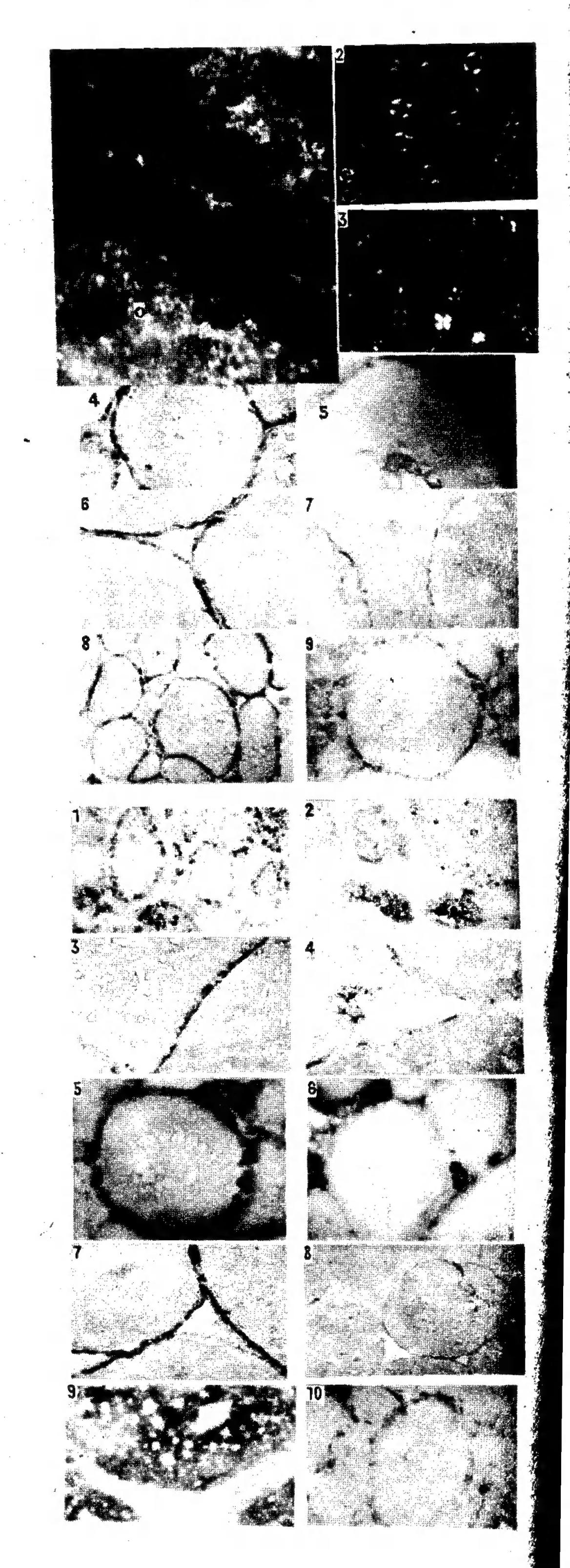
The ovary of ***Tilapia nilotica*** was histochemically examined. Within the developing oocytes the contents of RNA frequently decreases with the increase of the contents of lipids, carbohydrates and proteins. The activities of the lactic dehydrogenase (LDH), the succinic dehydrogenase (SDH) and the malic dehydrogenase (MDH) decrease while the activity of lipidase increases. It appears that the oocytes of the earlier stages are able to synthesize proteins actively.

The follicle cells are found to be abundant in lipids, carbohydrates, proteins and RNA. The activity of LDH here is rather strong, while the enzymes MDH, glucose—6—phosphate dehydrogenase (G—6—PDH), β—hydroxybutyric dehydrogenase (HBDH) are less active. The fact that the non-specific esterase (NLE) and the 3β—hydroxy-steroid dehydrogenase (3β—HSD) exist in the follicle epithelium indicates that the follicle cells can synthesize the steroid hormone.

Observations under the polarizing microscope reveal that the follicle epithelium is characterized by the presence of birefringence and "Maltese crosses". This suggests that cholesterol, which might be the precursor in synthesizing the steroid hormone, is stored in lipid droplets in a liquid crystal state.

孙建民等：尼罗罗非鱼卵巢发育过程中液晶态类脂滴组织化学初步研究

Sun Jianmin et al.: A Priliminary Study on the Histological Chemistry of the Ovary of Tilapia Nilotica During its Development



图版 I

1．第4时相卵母细胞以及滤胞细胞和间质区呈现双折射和“马尔它十字”小滴。
（0－卵母细胞　*F*－滤泡细胞，正交偏光　1100×）

2．第4时相卵母细胞胞质内的“马尔它十字”脂肪球。（正交偏光　160×）

3．第Ⅳ发育阶段卵巢间质区的“马尔它十字”类脂滴。（正交偏光　500×）

4．第3时相卵母细胞（*LDH*），胞质弱阳性，滤泡上皮强阳性反应。　80×

5．第4时相卵母细胞（*LDH*），胞质阴性，核阳性，滤泡上皮阳性反应。　80×

6．成熟准备排出的卵母细胞（*LDH*），胞质阴性，滤泡上皮阳性反应。　80×

7．退化的卵子（*LDH*），部份卵子周围的滤泡上皮弱阳性反应。　80×

8．第Ⅳ发育阶段卵巢（*LDH*），卵子周围的滤泡上皮阳性反应。　80×

9．第3时相卵母细胞（*MDH*），胞质弱阳性，滤泡上皮阳性反应。　80×

图版 II

1．第Ⅲ发育阶段卵巢（*SDH*），第3时相卵子胞质内二甲腊沉淀丛集于卵周边。　80×

2．第Ⅳ发育阶段卵巢（*SDH*），第2和第3时相卵子胞质阳性，第4时相卵子胞质及滤泡上皮阴性。80×

3．成熟准备排出的卵子（3β—*HSD*），胞质阴性，滤泡上皮阳性反应。　80×

4．第Ⅳ发育阶段卵巢（3β—*HSD*），部分间质区阳性反应。　80×

5．第Ⅲ发育阶段卵巢（*NLE*），第3时相卵子的滤泡上皮阳性反应，部份间质区阳性反应。　80×

6．第Ⅳ发育阶段卵巢（*NLE*），部份间质区呈强阳性反应。　80×

7．成熟准备排出的卵子（*NLE*），滤泡上皮阳性反应。　80×

8．同上　30×

9．第Ⅳ发育阶段卵巢（脂肪酶），第4时相卵子胞质阳性，滤泡上皮阴性，间质区阴性。　200×

10．第3时相卵母细胞（*G*—6—*PDH*），胞质阴性，滤泡上皮阳性。　80×